

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

金田 紗季

論文題目

糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植および  
歯髄幹細胞分泌因子投与による治療効果の比較検討

## I. 緒言

糖尿病性神経障害は、糖尿病合併症の中で最も罹患率が高く、患者の QOL に悪影響を及ぼす。糖尿病性神経障害の発症には、末梢神経の変性と血流障害が主に関与し、加齢、慢性炎症、心血管疾患などの要因も病態に影響を与える。糖尿病性神経障害に対する治療法は、痛みなどに対する対症療法が主であり、病因に基づく原因療法の開発が求められている。再生医療は糖尿病性神経障害の新たな治療法として期待されている。

糖尿病性神経障害に対する再生医療として、幹細胞移植により、糖尿病で低下した神経伝導速度、神経内血流量および表皮内神経線維密度が改善することが認められている。間葉系幹細胞の一種である歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells : DPSCs) は、矯正治療による抜去歯や智歯から容易に採取可能であり、分化能や増殖能に優れ、凍結による機能低下を認めないため、魅力的な幹細胞の供給源である。これまでに、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルを使用して、DPSCs の移植が糖尿病性神経障害に有効であることが報告されている。

幹細胞移植は、これまでの研究より、移植された幹細胞のほとんどが移植部位には定着しないことが判明しており、治療メカニズムとして、移植後の幹細胞からの豊富なセクレトームが大きく影響していると考えられている。さらに、歯髄幹細胞分泌因子 (secreted factors from DPSCs : DPSC-SFs) の投与が糖尿病ラットの神経伝導速度と神経内血流量を改善することが認

められている。しかし、DPSC 移植と DPSC-SF 投与を比較し糖尿病性神経障害の治療にどちらがより効果的であるかは明らかになっていない。この研究では、糖尿病性神経障害に対する DPSC 移植と DPSC-SF 投与による糖尿病性神経障害における治療効果について直接比較検討した。

## II. 実験材料および方法

### 1. 歯髄幹細胞の分離・培養

6 週齢雄性 green fluorescent protein (GFP)-transgenic Sprague-Dawley (SD) ラットの切歯から歯髄を採取し、DPSCs の分離・培養を行った。

### 2. 歯髄幹細胞分泌因子の作製

DPSC-SFs は、培養した DPSCs を、無血清培地にて 24 時間培養した後、培養上清を回収し、10 倍に濃縮したものをとして使用した。

### 3. 歯髄幹細胞および歯髄幹細胞分泌因子の投与

6 週齢雄性 SD ラットに STZ 腹腔内投与にて糖尿病を誘発し、8 週後に、糖尿病ラットの片側左側後肢骨格筋に DPSCs (1.0 mL、 $1 \times 10^6$  個 / rat) および DPSC-SFs (1.0 mL / rat) を 10 箇所に分けて投与した。投与 4 週後に、以下の測定を行った。

### 4. 坐骨神経における神経伝導速度および神経内血流量の評価

イソフルランによる吸入麻酔下でラットの神経伝導速度および神経内血流量を測定した。坐骨神経運動神経伝導速度 (motor nerve conduction velocity : MNCV) は、坐骨神経走行部位である足首と坐骨切痕部間で活動

電位を測定し、感覚神経伝導速度 (sensory nerve conduction velocity : SNCV) は腓腹神経走行部位である足首と膝裏間で活動電位を測定した。

坐骨神経内血流量 (sciatic nerve blood flow : SNBF) は、大腿皮膚を切開し、露出した坐骨神経にセンサーをあて計測を実施した。

#### 5. 足底皮膚における表皮内神経線維密度の評価

ラットを CO<sub>2</sub> 吸入により屠殺し、足底皮膚を採取した。厚さ 25  $\mu$ m の組織切片を作製し、PGP9.5 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、神経線維数を計測した。

#### 6. 後肢骨格筋における免疫組織染色

厚さ 5  $\mu$ m の組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色し、筋束の面積を測定した。また、切片を抗血小板内皮細胞接着分子-1 (PECAM-1) 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、血管内皮細胞数を計測した。

#### 7. 後肢骨格筋における遺伝子発現解析

ラットから採取した腓腹筋を用いて nerve growth factor (NGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、および neurotrophin-3 (NT-3) の mRNA 発現レベルを評価した。内在性コントロールとして  $\beta$ 2-microglobulin を用いて  $\Delta \Delta$ Ct 法で計算した。

#### 8. 歯髄幹細胞分泌因子の解析

DPSC-SFs に含まれるタンパク質を L-Series rat antibody array90 を用いて解析した。メンブレンのデータは ImageJ を用いて分析した。

## 9. 統計処理

全ての値は平均値±標準誤差 (SEM) で表した。統計分析は多重比較のために一元配置分散分析の Bonferroni 検定を用いて行った。差は、 $p < 0.05$  を有意とした。

## III. 結果

### 1. 体重および血糖値

糖尿病ラットは、正常ラットと比較して有意な体重減少と高血糖を認めた ( $p < 0.01$ )。また、DPSC 移植と DPSC-SF 投与は糖尿病ラットの体重と血糖値に有意な変動を与えなかった。

### 2. 坐骨神経運動/感覚神経伝導速度および坐骨神経内血流量

正常ラットと比較して、糖尿病ラットでは、MNCV、SNCV の遅延、SNBF の減少を認めた。DPSC 移植、DPSC-SF 投与ともに、糖尿病ラットで低下した MNCV、SNCV および SNBF の改善が認められたが、DPSC 移植と DPSC-SF 投与による改善効果に有意な差は認められなかった。

### 3. 足底皮膚における表皮内神経線維密度

足底における表皮内神経線維密度 (intraepidermal nerve fiber density: IENFD) は、糖尿病ラットにおいて正常ラットと比較し、50%の減少を認めた ( $p < 0.01$ )。糖尿病ラットへの DPSC 移植および DPSC-SF 投与により、DPSC 移植では 88%、DPSC-SF 投与では 81%の IENFD の有意な増加を認めた ( $p < 0.01$ )。DPSC 移植と DPSC-SF 投与の間の改善効果に有意な差

は認められなかった。

#### 4. 後肢骨格筋における筋束サイズおよび毛細血管筋束比

糖尿病ラットでは、筋束の平均サイズが、正常ラットと比較して 44%に減少した ( $p < 0.001$ )。糖尿病ラットと比較し、DPSC 移植では 145%、DPSC-SF 投与で 146%の有意な筋束サイズの増加を認めた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。DPSC 移植糖尿病ラットと DPSC-SF 投与糖尿病ラット間の筋束サイズに有意差は認めなかった。

毛細血管筋束比は、糖尿病ラットで正常ラットと比較し、41%減少した ( $p < 0.001$ )。糖尿病で減少した後肢骨格筋における毛細血管筋束比は、DPSC 移植、90%および DPSC-SF 投与により、それぞれ 90%および 82%の改善を認めた ( $p < 0.001$ )。DPSC 移植と DPSC-SF 投与との間の毛細血管筋束比における改善効果に有意な差は認められなかった。

#### 5. 後肢骨格筋における遺伝子発現

糖尿病ラットと比較し、DPSC-SF 投与糖尿病ラットでは、NGF、bFGF、および NT-3 遺伝子発現の増加傾向、DPSC 移植糖尿病ラットでは NT-3 遺伝子発現の増加傾向を認めたが、どちらも遺伝子発現に有意差は認めなかった。

#### 6. 歯髄幹細胞分泌因子におけるタンパク質発現

DPSC-SFs には調査した 90 種類のタンパク質のうち、血管新生因子、神経栄養因子および免疫制御因子などを中心に 17 種類以上のタンパク質が含まれていることが確認された。

#### IV. 考察

本研究では、糖尿病性神経障害に対する DPSC 移植と DPSC-SF 投与の治療効果を直接比較検討した。後肢骨格筋への DPSC 移植と DPSC-SF 投与のいずれにおいても、糖尿病ラットで遅延および減少した MNCV、SNCV および SNBF が改善され、これら 2 つの異なる治療法の間で改善効果の程度はほぼ同じであった。

糖尿病性神経障害に対する幹細胞移植の治療メカニズムとして、血管新生作用による血流改善、抗炎症作用、神経保護作用が報告されている。一方、ほとんどの移植された前駆細胞および幹細胞は、移植後一定期間経過すると、移植部位より消失する。そのため、前駆細胞および幹細胞移植の治療メカニズムは、移植の初期段階の幹細胞からの豊富なセクレトームが主に関連していると考えられている。

DPSC 移植と DPSC-SF 投与を直接比較すると、糖尿病性神経障害に対する治療の有効性は、どちらも投与後少なくとも 4 週間の時点において、ほぼ同等の効果を認めることが明らかとなった。これらの結果より、DPSC 移植および DPSC-SF 投与の 4 週間後の糖尿病性神経障害に対する両者の治療効果は、DPSC 移植初期の DPSCs から分泌された、または直接投与された DPSC-SFs による複数のセクレトームによることが主な要因であることが示唆された。

一方で、移植された DPSCs の一部は移植部位に残存し、血管内皮様細胞

に分化することが確認されている。これは、DPSC 移植が DPSC-SF 投与より長期間の治療効果を示す可能性を示唆しており、さらに両者の治療効果について投与量、投与回数、有効期間を含めて検討していく必要がある。

#### V. まとめ

本研究より、骨格筋への DPSC 移植と DPSC-SF 投与による治療効果の直接比較では、同等の効果をもって糖尿病性神経障害を改善することが明らかとなった。一方で、それぞれの有用性とリスクには違いもあるため、今後投与方法や適応についてのさらなる検討が必要である。